

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630412

研究課題名(和文) バイオ燃料の生産に向けた未利用栄養塩利用での藻類の培養と油生産促進技術の開発

研究課題名(英文) Cultivation of oil-producing algae using unused nutrients toward to produce biofuel

研究代表者

中井 智司 (Nakai, Satoshi)

広島大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80313295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：幅広い塩分濃度で増殖でき、かつアンモニア態窒素に対する耐性を有する藻類株を見だし、藻類培養への消化液の利用性可能性を評価した。藍藻類A株と緑藻類C株の最大増殖量と脂質生産量は塩分による影響を受けなかった。さらに窒素源をNH₄Clとした改変f/2培地を用いて両株のアンモニア耐性を評価した結果、両株ともアンモニア態窒素濃度0.9～57.6 mMで増殖できた。下水二次処理水や海水で希釈した消化液において、A株及びC株は増殖し、脂質を生産した。しかしながら、消化液にはA株及びC株の増殖を低下させる因子が含まれた。消化液の希釈液としては下水二次処理水の方が好適であった。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to search for algal strains that grow at a wide range of salinity and has tolerance against ammonium nitrogen and to investigate an anaerobic digestion effluent as a medium for algal culturing. The results showed that at a range from 0.2‰ to 30.6‰ salinity did not affect the maximum growth and lipid productivity of strains A and C. The strains A and C grew at a range from 0.9 mM to 57.6 mM of ammonium nitrogen concentration. Although the maximum growth of strains A and C at this concentration was higher than that cultured in the normal f/2 medium, nitrate nitrogen was preferable for the strains A and C than ammonium nitrogen. The strains A and C grew and produced lipid in the anaerobic digestion effluent diluted with the secondarily treated sewage or seawater. As a dilution media for the anaerobic digestion effluent, the secondarily treated sewage was better than sea water.

研究分野：環境工学

キーワード：アンモニア耐性 消化污泥脱離液 好塩性藻類 塩分ストレス耐性 下水二次処理水

1. 研究開始当初の背景

油を生産する藻類は、非穀物のバイオ燃料の原料として注目されている。藻類は、陸生植物と比較して成長が早く単位面積当たりの生産性が高い。しかしながら、藻類を原料としたバイオ燃料の製造にはエネルギー面、経済面での課題がある。例えば、藻類バイオマス生産のエネルギーバランスにおいて、藻類の培養と藻体回収工程には、太陽光を利用した開放系で最大約 30%、閉鎖系では 90% 以上を占めるとの試算がある。従って、藻類の培養と藻体回収工程の改善が藻類によるバイオ燃料生産の実現のための課題の一つである。

畜産排水や嫌気消化液に含まれる窒素の主な形態はアンモニア態窒素であるが、高濃度のアンモニア態窒素は藻類の増殖を阻害する。例えば、*B. braunii* は 1 mM-N 以上、*Dunaliella tertiolecta* では 3 mM-N 以上で炭素の取り込みが阻害された。また、人工海水を用いて希釈した消化液での *Synechocystis* sp. や *Nannochloropsis salina* の培養例において、前者では 6/100 以上(アンモニア態窒素 9.8 mM-N 含有)、後者では 18/100 以上(同窒素 29 mM-N 含有)消化液を含有すると増殖量や脂質生産量の低下が生じた。さらに、畜産排水や消化液は塩分も含む。従って、畜産排水や消化液を培地として使用するためには、アンモニア態窒素や塩分への耐性を有する藻類の適用が望ましい。

そこで本研究では、汽水～海水に生息する好塩性の藻類に着目した。海水に生息する藻類は、淡水に生息する藻類と比較してアンモニア態窒素などの無機窒素化合物に対する耐性が高いことが期待される。また、好塩性の藻類は淡水性の藻類よりも高塩分環境にも適応できる。アンモニア態窒素や塩分への高い耐性は、他藻類との競合において有利であり、開放系での培養に好適であることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、汽水～海水域から分離された好塩性の藻類を用い、塩分やアンモニア態窒素濃度に対する耐性と脂質生産性を評価した。そして、藻類培養への消化液の利用可能性を明らかにするため、下水二次処理水や海水を用いて希釈した消化液における藻類の増殖と脂質生産量を評価した。

3. 研究の方法

(1) 藻類及び培地

汽水～海水域から採取された藍藻類、緑藻類、珪藻類を用いた。これらの藻類の培地は、広島大学瀬戸内圏フィールド科学教育研究センター竹原ステーション(広島県竹原市)で

採取した砂ろ過海水(pH8.0, 塩分濃度 30.6 ‰)に f/2 培地相当分の栄養塩を加えて作成した。但し、塩分濃度による増殖や脂質生産への影響を評価する際には、同砂ろ過海水に超純水を加えて希釈して塩分を 0.2 ‰～30.6 ‰とした。0.2 ‰は、本実験で用いた下水二次処理水の塩分濃度(表-1)よりも低い。一方、アンモニア態窒素濃度による増殖や脂質生産性への影響を評価する際には、海水(30.6 ‰)を使用し、培地の窒素源を NaNO₃ から NH₄Cl に変更した。f/2 培地の窒素濃度は 0.9 mM であったため、この実験でのアンモニア態窒素の濃度は、0.9 mM～57.6 mM とした。但し、他の無機塩について通常の f/2 培地と同様とした。また、pH の変動に伴う影響を排除するため、培地にトリスヒドロキシメチルアミノメタンを 1 g/L にて加えて pH8 とした。

(2) 消化液及び下水二次処理水

消化液は、広島県広島市の太田川東部浄化センターのメタン発酵工程で発生したものをを用いた。また、下水二次処理水は、広島県東広島市の東広島浄化センターから採取した。両試料を採取後、直ちにガラス繊維濾紙および 0.45 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過した。さらに、消化液については、硫化水素の除去のため、ろ液にエアストーンを入れて 24 h 曝気した。各々の水質は表-1 の通りである。そして、アンモニア態窒素が 3.6 mM, 7.2 mM となるように消化液を下水二次処理水や海水を用いて希釈した。

表-1. 下水二次処理水(STS)及び消化液(ADE)の水質

項目	STS	ADE
pH [-]	7.0	8.8
塩分 [‰]	0.7	2.3
溶存有機炭素	22	120
D-N [mM]	0.82	44
NH ₄ -N [mM]	0.78	33
NO ₂₊₃ -N [mM]	< 0.06	< 0.06
D-P [mM]	0.014	5.5
PO ₄ -P [mM]	< 0.04	6.5

(3) 藻類の培養

調製した培地 100 mL を 500 mL 三角フラスコに入れてオートクレーブ滅菌した。希釈した消化液を用いた培養の際には、予めオートクレーブ滅菌しておいた 0.22 μm のメンブレンフィルターを用いてろ過した液 100 mL を 500 mL 三角フラスコに入れた。そして、濁度が 1～1.5 となるように藻類を植種した後、25 ℃, 90 μmol m⁻² s⁻¹ の光照射下で、70 rpm で回転振盪培養した。なお、培養は 3 連で行

った．また，培養期間中の藻類の増殖は濁度に基づいてモニタリングした．最大増殖量は培養液をガラス繊維ろ紙でろ過し，超純水での洗浄の後，105 で2時間乾燥して得た．

(4) 分析方法

藻体内に含まれる脂質の分析は，凍結乾燥した藻体に対し，2:1 (v/v) クロロホルム - メタノールの混合液による抽出操作を行う Folch 法に従った．一方，下水二次処理水及び消化液は次のように分析した．溶存有機炭素濃度は，ガラス繊維ろ紙を用いてろ過した試料を全有機炭素計に注入して測定した．また，溶存態窒素及び溶存態リンはペルオキシ二硫酸カリウム分解の後，各々紫外線吸光度法及びモリブデン青法により，アンモニア態窒素はインドフェノール青法により定量分析した．さらに，硝酸態，亜硝酸態窒素やリン態リンの定量は，イオンクロマトグラフにより行った．

4. 研究成果

(1) 塩分耐性に基づくスクリーニング

塩分濃度を調整したf/2培地での藍藻類A株，緑藻類B、C株の増殖曲線を図-1に示す．A株は下水二次処理水の塩分濃度(表-1)を下回る0.2 ‰であっても増殖し，塩分濃度に関係なく培養5日目に定常期に達した．C株は14日目に定常期に達した．

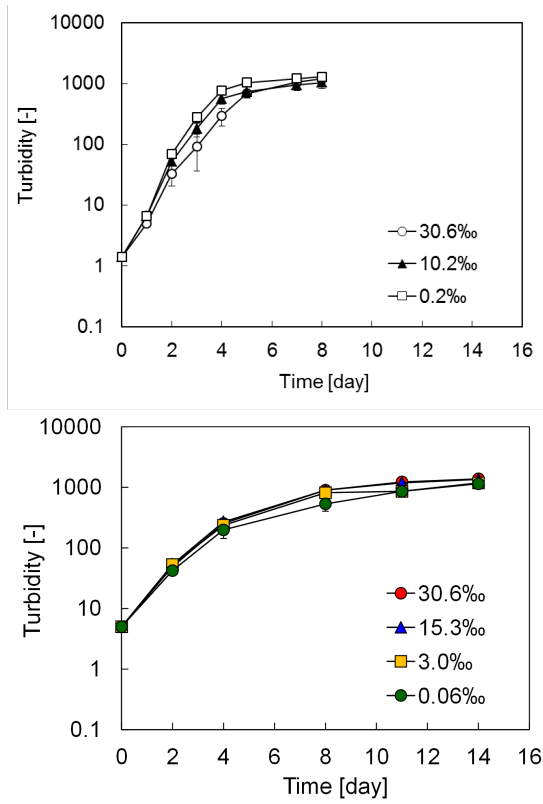


図-1. 塩分濃度の異なる培地での藍藻類A株(上)，緑藻類C株(下)の増殖曲線(バーは，標準偏差(n=3)を示す)

A株の比増殖速度を求めた結果，図-2に示すように塩分濃度の減少と共に比増殖速度が増加することが認められた．この原因は不明であるが，高塩分濃度下では細胞内外の塩分濃度の差の調整にエネルギーを費やした可能性が考えられる．また，海産性，淡水性藻類共に塩分濃度が変化すると増殖量，脂質生産量が変化することが報告されているが，30.6 ‰ ~ 0.2 ‰程度の塩分濃度の変化はA株やC株の最大増殖量や脂質生産量に影響するほどではなかった．なお，図中の生産量は培地単位体積あたりの数値である．このように，A株やC株は幅広い塩分濃度にも対応して増殖，脂質を生産できることが明らかとなった．

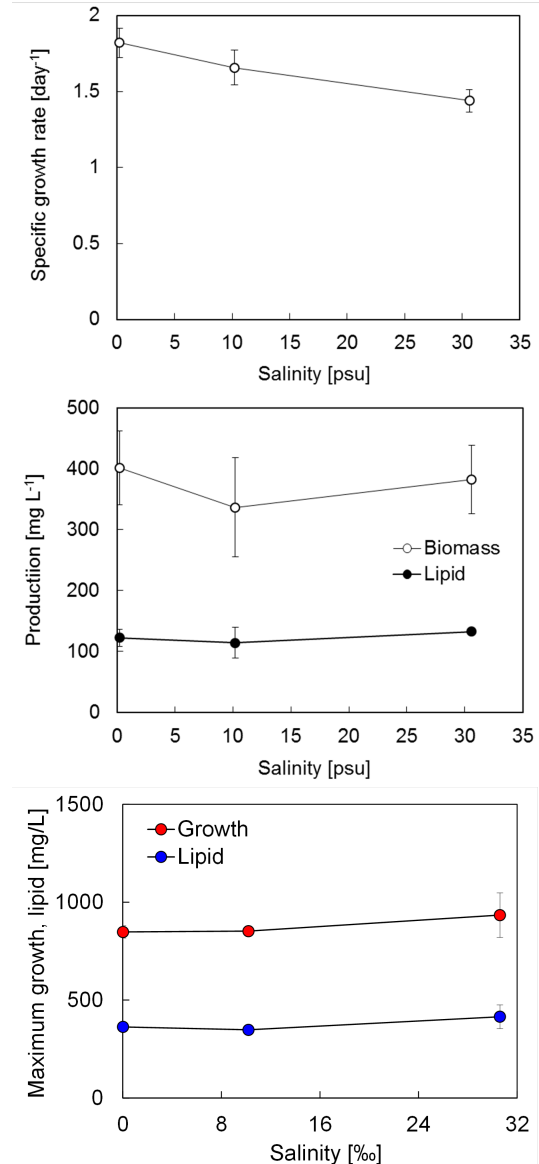


図-2. 塩分濃度を变化させた際のA株の比増殖速度(上)，最大増殖量，脂質生産量(中)，C株の最大増殖量，脂質生産量(バーは，標準偏差 (n=3)を示す)

なお，増殖の速いA株の比増殖速度は，塩分濃度30.6‰においても1.4 d⁻¹であり，C株(1.0 d⁻¹)や本研究と同じf/2培地，25 ，高い光

量(200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)にて培養された*N. oculata* (0.14 d^{-1}), *Nannochloropsis* sp. (0.28 d^{-1}), 同じ25 °Cではあるが, 各無機塩濃度をf/2培地の3倍に改変した培地を用いて高い光量(260 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)にて培養された*N. oculata* (0.59 d^{-1}), 培養条件が最適化された状態での*N. salina* (1.3 d^{-1})よりも高かった。

(2) アンモニア態窒素による増殖と脂質生産への影響

f/2培地の窒素源を NaNO_3 (0.9 mM)から NH_4Cl (同濃度)に変更した際のA株の増殖曲線を図-3に示す。A株はアンモニア態窒素下での増殖は可能であったが, 窒素源が硝酸態からアンモニア態となることで増殖能が若干低下した。また, C株についても同様であった。従って, 窒素源としてはアンモニア態窒素よりも硝酸態窒素の方が好適であった。本培養実験開始時(25 °C, pH8)において, 培地に加えたアンモニア態窒素の5.4% (0.048 mM)が遊離アンモニアとして存在していることがアンモニア態窒素の解離定数より推定され, その遊離アンモニアによって増殖が低下した可能性が考えられた。

一方, アンモニア態窒素濃度を増加させるとA株の最大増殖量は増加した。アンモニア態窒素濃度14.4 mMのときに最も高くなり, その値はf/2培地での増殖量を上回った(図-4)。また, 28.8 mM以上になると増殖量は低下した。このような現象は, 遊離アンモニアによる増殖低下が生じる反面, 利用可能な窒素濃度が増加したが, 14.4 mM以上では他の元素が不足し, 窒素濃度の増加による効果が失われたためと考えられた。また, C株については, 3.6 mM ~ 14.4 mMでf/2培地を上回ったが, A株と同様に28.8 mM以上になると増殖量は低下した。

なお, 図-4に示されるデータより求めたA株の脂質含有率は表-2の通りであり, アンモニア態窒素の増加と共に, 脂質含有率が低下することが認められた。窒素枯渇は藻類の脂質含有率を増加させることが報告されているが, 藍藻類(シアノバクテリア)であるA株においても同様であり, 窒素が潤沢であるほど脂質生産量が低下することが示された。

窒素源を改変したf/2培地を用いた培養試験において, A株やC株の最大増殖量が高くなった濃度14.4 mM (198.4 mg-N/L)Cは, 例えば同じ海洋性の*Nannochloropsis* sp.が増殖できなかったろ過水のアンモニア態窒素濃度(92.0 mg-N/L, 6.6 mM), 消化液を用いた培養にて*N. salina*の増殖量が最大となったアンモニア態窒素濃度(137 mg-N/L, 9.8 mM)よりも高い。さらに, 筆者らはアンモニア態窒素濃度を3.9 mMとした改変Chu培地での*B. braunii*の最大増殖量は, 通常のChu培地の20%程度

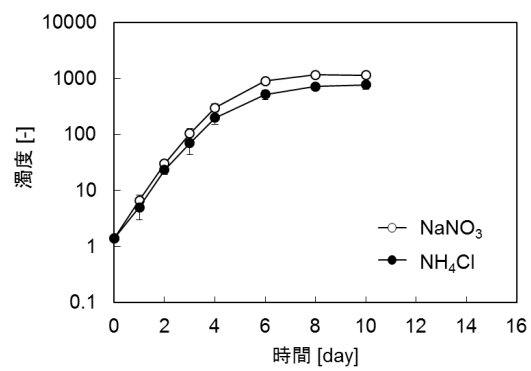


図-3. 窒素源を硝酸態, アンモニア態とした培地(各0.9 mM)でのA株の増殖挙動(バーは, 標準偏差(n=3)を示す)

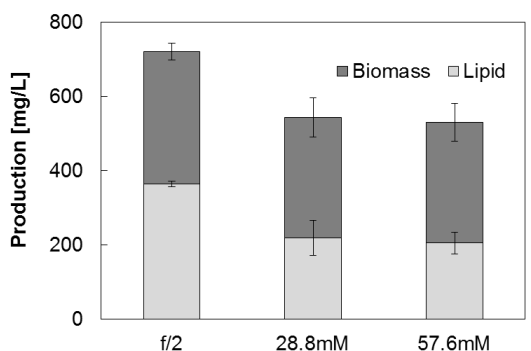
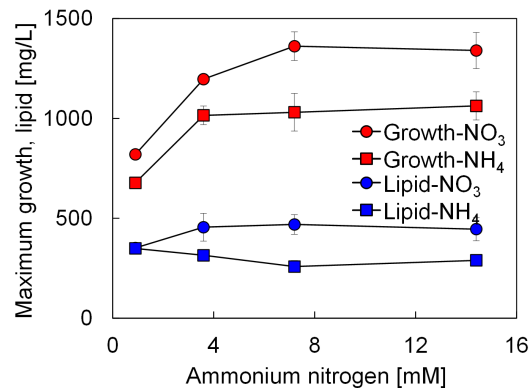
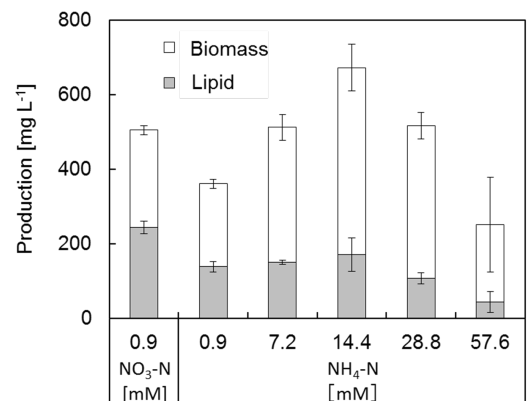


図-4. アンモニア態窒素濃度によるA株(上), C株(中, 下)の最大増殖量, 脂質重量への影響(バーは, 標準偏差(n=3)を示す)

であることも確認した(データは省略する)。なお, 比増殖速度については, A株は表-2に

示すようにいずれの濃度でも1.0 d⁻¹程度、C株も同程度であり、(1)で述べた*Nannochloropsis oculata* (0.14 d⁻¹)、*Nannochloropsis* sp. (0.28 d⁻¹)、*N. oculata* (0.59 d⁻¹)よりも高く、消化液のようにアンモニア態窒素濃度が高い排水への適用が期待された。

表-2. f/2培地の窒素源を変化させた際のA株の脂質含有率及び比増殖速度

N 源 [mM]	NO ₃ -N	NH ₄ -N				
	0.9	0.9	7.2	14.4	28.8	57.6
脂質 [%]	48	38	29	25	21	18
比増殖速度 [d ⁻¹]	1.4	1.1	1.1	1.0	0.90	1.0

(3) 希釈した消化液の藻類培養への適用

硝酸態窒素を0.9 mM 含むf/2培地、下水二次処理水、同処理水で希釈してアンモニア態窒素濃度を3.6 mM、7.2 mMに調整した消化液でのA株の増殖曲線を図-5に、培養に伴う窒素やリンの消費の状況を図-6、図-7に示す。

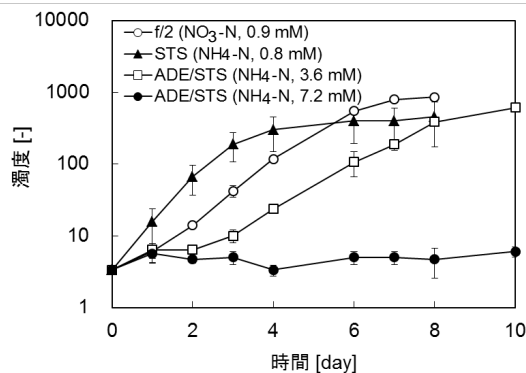


図-5. f/2培地、下水二次処理水(STS)ならびに下水二次処理水で希釈した消化液(ADE/STS)におけるA株の増殖曲線(バーは、標準偏差(n=3)を示す)

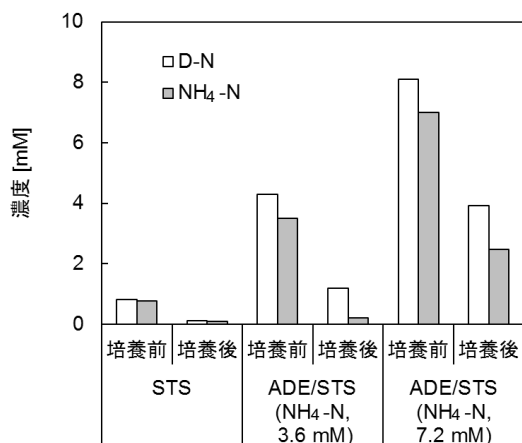


図-6. 下水二次処理水(STS)ならびに下水二次処理水で希釈した消化液(ADE/STS)でのA株培養時の溶存態窒素、アンモニア態窒素の消費

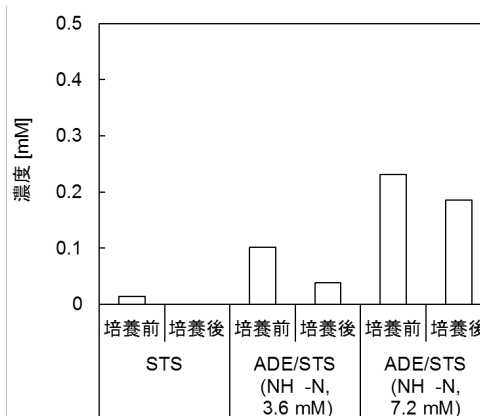


図-7. 下水二次処理水(STS)ならびに下水二次処理水で希釈した消化液(ADE/STS)でのA株培養時の溶存態リンの消費

下水二次処理水の栄養塩濃度(表-1)はf/2培地よりも低いため、最大増殖量は同培地には及ばないものの、下水二次処理水においてA株は良好な増殖挙動を示した(図-5)。この時の窒素やリンの残存状況から、下水二次処理水でのA株の増殖ではリンが制限因子となっていた可能性が示された(図-6、図-7)。その一方で、下水二次処理水を消化液の希釈液として使用した場合、アンモニア態窒素3.6 mMでは誘導期の延長と比増殖速度の低下が生じた(図-5)。さらに、7.2 mMでは、A株はほとんど増殖しなかった。

f/2培地、下水二次処理水ならびに海水で希釈した消化液でのA株及びC株の最大増殖量と脂質生産量を図-8に示す。両株の最大増殖量と脂質生産量は希釈液によって異なった。両株ともアンモニア態窒素を3.6 mMとなるように下水二次処理水を用いて希釈した消化液の系列において、希釈に海水を用いた場合よりも下水二次処理水を用いた方が最大増殖量と脂質生産量が大きかった。従って、消化液を藻類の培地として利用する際、希釈液としては海水よりも下水二次処理水の方が好適であることが明らかとなった。

なお、海水を用いて消化液を希釈した際に、白色の析出物の生成が認められたが、この析出物は希釈液をフラスコに注入する滅菌ろ過の際に除去された。一方、下水二次処理水を用いた希釈の際には、そうした現象は認められなかった。さらに、他株による希釈消化液への微量元素の添加試験(図-9)からも、海水を用いた希釈液において最大増殖量と脂質生産量が低下した原因の一つとして、析出に伴って増殖に必要な成分が一部除去された可能性が推定された。

なお、希釈した消化液のアンモニア態窒素濃度は3.6 mM、7.2 mMであり、窒素源をアンモニア態窒素とした改変 f/2 培地での培養試験の結果(図-4)からは阻害が生じる濃度ではない。従って、増殖が低下した要因として

重金属や有機物が考えられた。下水汚泥には銅などの重金属が含まれることは広く知られる。一方、脂質がメタン発酵に至る過程において、中間生成物としてオレイン酸などの高級脂肪酸が生成することも報告されているが、オレイン酸は藍藻類の増殖を抑制する効果も有する。本研究ではこれらの分析を行っていないが、今後これらの濃度等を分析した上で、増殖阻害の原因を明らかにする必要がある。

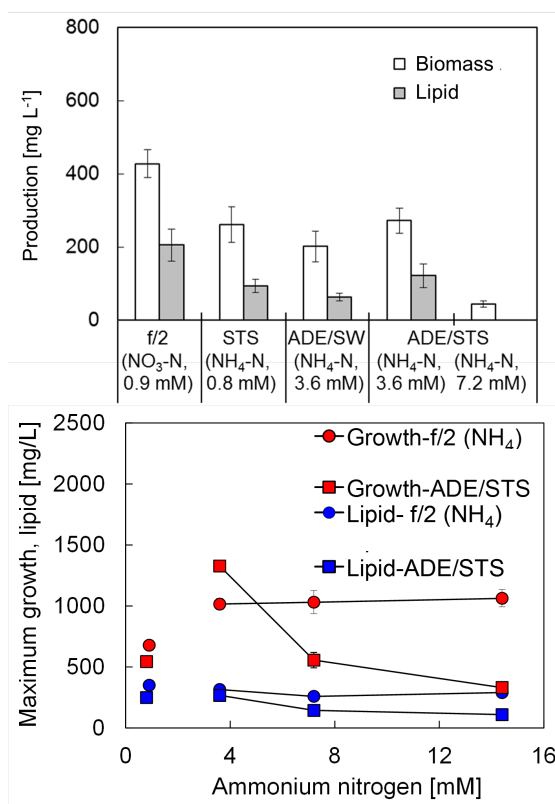


図-8 . f/2培地，下水二次処理水(STS)ならびに海水で希釈した消化液(ADE/SW)，下水二次処理水で希釈した消化液(ADE/STS)でのA株(上)、C株(中、下)の最大増殖量と脂質生産量(バーは、標準偏差(n=3)を示す)

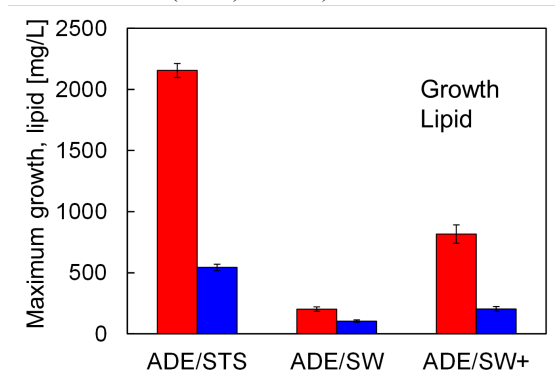


図-9 . 下水二次処理水(STS)ならびに海水で希釈した消化液(ADE/SW)，海水で希釈した消化液(ADE/SW)に微量元素を加えたもの

(ADE/SW+)での C 株の増殖量と脂質生産量(バーは、標準偏差(n=3)を示す)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

中井 智司、奥田哲士、西嶋 渉、大野正貴、松本光史：高濃度のアンモニア態窒素を含むメタン発酵 消化液を用いた油生産藻類の培養、土木学会論文集(環境) 70、III 493-499 (2014.12)、査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

S. Nakai, T. Okuda, W. Nishijima, M. Matsumoto: Oil-producing algal cultivation using an anaerobic digestion effluent, The 5th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, San Diego, USA, 2015/6/7 ~ 2015/6/10

中井 智司、奥田哲士、西嶋 渉、大野正貴、松本光史：高濃度のアンモニア態窒素を含むメタン発酵消化液を用いた油生産藻類の培養、第 51 回環境工学研究フォーラム、山梨大学、2014/12/20 ~ 2014/12/22

S. Nakai, N. Itamura, T. Okuda, W. Nishijima, M. Matsumoto: Lipid production by cultivating a green alga strain C in wastewater containing ammonium nitrogen, The 4th International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts, Santa Fe, USA, 2014/6/15 ~ 2014/6/18

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/nakai/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中井 智司 (Satoshi NAKAI)

広島大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80313295

(2)研究分担者

西嶋 渉 (Wataru NISHIJIMA)

広島大学・環境安全センター・教授

研究者番号：20243602

(3)連携研究者

なし